DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.036

Ⅰ、XbaⅠ、EcoRV、HpaⅠ、ScaⅠ共11种限制性内切酶,分析了包括人肺腺癌 SPC-A-1、A531、PLA-801D、A549,人肝细胞癌 SMMC-7721和人膀胱上皮癌 EJ共6个癌细胞系 mtDNA的 RFLP变化,并根据双酶切结果,构建了 SPC-A-1细胞 mtDNA限制酶切图谱。结果发现,6个癌细胞系其 mtDNA基因编码区的32个酶切位点均无变异,而有3个癌细胞系在其 mtDNA非编码区第16276位核苷酸处出现了 EcoRV新的酶切位点。

(3) mtDNA基因编码区的细胞色素氧化酶亚单位Ⅱ(CoⅡ)和 ATP酶亚单位8加6(ATPase8+6)基因 PCR产物 RFLP(HaeⅢ)分析,与16例患者外周血白细胞 mtDNA相应基因 PCR-RFLP分析结果对比,发现6个癌细胞系其 mtDNA该基因核酸片段均未出现明显多态性。

(4)测序结果显示,癌细胞 mtDNA基因编码区碱基突变率为0.58%,显著低于正常人群突变率(0.9%);而基因非编码区碱基突变率为3.39%,尤其是 SPC-A-1、A531、SMMC-7721共3个癌细胞系和2例肺癌患者白细胞,其 mtDNA非编码区的重链复制起点及其相邻的 D环区碱基突变率达6.43%,并发现了多个 C→T核苷酸突变和 GGCC序列。

(5) FISH分析结果显示,在6个癌细胞系的部分中期染色体或间期细胞核中,检测出了 mtDNA探针的阳性杂交信号,而原代培养人皮肤成纤维细胞无阳性杂交信号。

(6)将 mtDNA 1626 bp目的基因片段导入 NIH3T3细胞胞质中,在转染后1周的部分培养细胞核中发现有目的基因探针的阳性杂交信号;转染后2周的培养细胞获得了在裸小鼠皮下形成移植瘤的能力;病理观察发现移植瘤的病理表现与纤维母细胞肉瘤的特征相一致。

结果表明:① 本组癌细胞系的 mtDNA基因编码区核苷酸序列非常保守,而主要的核苷酸变异则位于其非编码区,尤其是 mtDNA非编码区重链复制起点及其相邻的 D环区碱基序列的特征性突变可能与细胞癌变或癌的易感性有关。② 癌细胞核基因组中存在 mtDNA的同源序列,这些同源序列的出现可能与细胞癌变密切相关。③ 基因转染实验进一步证明了 mtDNA片段在核基因组中的自发整合是促发细胞癌变的又一因素。

关键词 线粒体 DNA;结构;突变;自发整合;核 DNA;恶性转化

中图法分类号 R73-3

(收稿: 1997-11-06;修回: 1997-12-14)

(编辑 王 红)

单克隆抗体3D3轻重链可变区基因克隆及其在 E. coli中表达*

Cloning and expression in E. Coli of the VH/VL gene of monodonal antibody 3D3

史依仁** 郭先健 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所)重庆,400037

从鼠抗人肺癌单克隆抗体3D3杂交瘤细胞中分离出其轻重链可变区基因,并表达制备其 ScFv融合蛋白,为进一步研究其结构功能及应用奠定基础。单克隆抗体3D3(McAb3D3)重链可变区基因 cDNA克隆及测序:以 McAb3D3杂交瘤细胞总 RNA为模板,以设计合成引物 VH For、VH Back进行逆转录 PCR扩增,电洗脱法回收扩增特异± 360 bp DNA片段,以 SmaⅠ XbaⅠ双酶切 VHcDNA及 puc18/puc19,电穿孔法转染 JM109菌,筛选、鉴定,双脱氧末端终止法对重组质粒 puc18 H/puc19 H进行测序;以相同方法,以设计合成轻链可变区引物 VLFor、VLBack,扩增轻链可变区基因 cDNA(VLcDNA),以粘末端方式将 VLcDNA克隆至 puc18,双脱氧末端终止法对重组 puc18L进行三轮测序;表达载体 pIgscFV构建及其在 BL21菌中表达:① SmaⅠ XbaⅠ分别消化 puc18 H及 pIg20质粒,以粘末端方式,将 VHcDNA克隆至 pIg20质粒,电穿孔法转染 BL21菌,筛选、鉴定,阳性子命名为 pIg VH;② 以 BglⅡ、NcdⅠ分别酶切 pIg VH及 VLcDNA,将 BglⅡ-VLcDNA-NcdⅠ片段克隆至 pIg VH,构建 pIgScFv表达载体,筛选,鉴定;③ 电穿孔法,将 pIgScFv转染 BL21菌,IPTG诱导培养,超声破菌法分级分离表达产物,SDS-PAGE电泳对表达产物进行检测,间接免疫荧光法对表达 ScFV融合蛋白活性进行检测。

双脱氧末端终止法测序结果显示: McAb3D3 VHcDNA全长序列为354bp,编码118个氨基酸,CDR1、CDR2、CDR3分别有5、17、9个氨基酸残基,同源性分析显示: VHcDNA与小鼠 Ig重链可变区基因有较高同源性,与其它基因不存在显著意义同源,VHcDNA编码氨基酸序列与小鼠 Ig重链可变区Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ组同源性分别为40%、71%、49%、60%,进一步比较与小鼠 IgⅡ(A)、Ⅱ(B)、Ⅱ(C)亚组同源性分别为60%、63%、78%,JH基因编码氨基酸序列符合 JH_2基因编码氨基酸序列特点。因此,McAb3D3 VH基因是由 VH-D-JH_2基因重排而成;VLcDNA全长序列为330 bp,编码110个氨基酸,同源性检索显示,VLcDNA与小鼠免疫球蛋白轻链可变区基因同源性达75%~85%,与其它基因无显著意义同源,其 CDR1、CDR2、CDR3分别有11、6、9个氨基酸残基,其编码氨基酸序列与小鼠 Ig轻链各亚组Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ同源性分别为50%、54%、55%、57%、73%,其 JK基因编码氨基酸序列符合 JK_2组氨基酸序列特点。因此,McAb3D3 VL基因系 V_K-JK_2基因重排而成,属小鼠免疫球蛋白 VL基因Ⅴ亚组;含 pIgScFv载体 BL21菌,经 IPTG诱导培养,分级分离产物 SDS-PAGE电泳见有35 kD左右蛋白泳

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39300015

** 史依仁,男,31岁,住院医师,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

带,对照空白载体无此蛋白泳带,分子量符合由硷基序列推导氨基酸计算 scFV 融合蛋白分子量,表明 pIgScFv在 BL21菌中获得表达。间接免疫荧光试验示,McAb3D3与 A549细胞反应性荧光亮度(++),ScFv融合蛋白(+),空白载体对照(-),表明 ScFv融合蛋白有一定抗原结合活性。

我们采用逆转录 PCR法,利用设计合成引物,从鼠抗人肺癌单克隆抗体 3D3杂交瘤细胞中分离出其轻重链可变区基因,并将 McAb3D3轻重链可变区基因分别克隆至 pIg20载体,并通过 pIg20载体所含(GLy4 SER)3 Linker基因序列,将 VH和 VL基因连接,构建 ScFV 基因,表达制备出 McAb3D3 ScFv融合蛋白。该融合蛋白含 McAb3D3 VL、VH片段,Linker肽及 58个氨基酸葡萄球菌蛋白 A,分子量为 35 KD,且表达 ScFv有抗原结合活性。McAb3D3识别的抗原在人肺癌细胞膜上有较高表达。由于 Fv片段分子小,穿透力强,易被清除等特点,十分适合于临床治疗、影像诊断及抗体分子构象分析等。因此,表达制备 ScFv融合蛋白有潜在应用前景。

关键词　单克隆抗体;基因;表达
中图法分类号　R392.11
(收稿: 1997-12-10;修回: 1998-01-06)
(编辑　王　红)

卵巢癌的腹腔播散机制与放化疗作用的实验研究

The experimental studies on the mechanism of abdominal cavity dissemination of ovarian cancer and the effects of radiochemotherapy

程　湘*　程天民　(第三军医大学预防医学系防原医学教研室 全军复合伤研究所)重庆,400038

卵巢癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一,病死率极高。腹腔播散是病变发展及导致死亡的重要环节,对其发生机制知之尚少。卵巢癌的治疗也采用放疗和化疗,但选用何种药物及放化疗如何组合以提高疗效,尚缺乏系列研究。本课题建立了大鼠卵巢肿瘤模型和具有较高恶性潜能的癌细胞亚系,从宏观到分子多个层次、在体与离体相结合上,研究了卵巢癌腹腔播散的特点及可能机制,并以多种化疗药物和不同照射剂量相组合,研究对卵巢癌的治疗、主要是抑制腹腔播散的效果。较系列的研究获得以下主要结果:

(1)首次用人工基质胶 Matrigel分离 3AO卵巢癌细胞系,建立了亚系 M951。M951细胞的生长情况与 3AO细胞相似,但粘附力较高,腹腔播散发生率也较高,这反映了卵巢癌细胞的异质性,M951细胞具有更高的恶性程度。高粘附力亚系的建立,为卵巢癌腹腔播散机理的研究提供了较理想的模型。

(2)采用 DMBA埋线法给药,成功地建立了大鼠卵巢肿瘤模型,具有癌发生率高、诱癌时间短、组织学类型较多、腹腔播散多见、可发生局部浸润和多种途径的转移等特点,是卵巢癌研究的较理想模型。我们观察到大鼠卵巢肿瘤组织中有正常卵巢结构存在,腺癌组织中有囊腺瘤,鳞癌组织中有正常鳞状上皮向鳞癌的过渡区,表面未见转移的肺脏实质组织中有微小转移灶存在,这些病理所见有利于探讨卵巢肿瘤的发生机制。

(3)首次以新鲜制备的大鼠腹膜为粘附组织,建立了卵巢癌细胞粘附腹膜的体外模型,具有较好地模似体内过程和可直接观察干预因素的影响等特点,适合于体外研究卵巢癌腹腔播散过程中的粘附机制。

(4)采用体外粘附腹膜模型,研究了卵巢癌细胞表达 CD44与其粘附腹膜能力的关系,结果显示 CD44表达与卵巢癌细胞粘附腹膜具有很好的相关性,首次提出直接证据,证实 CD44分子与卵巢癌细胞粘附腹膜能力相关,参与了卵巢癌的腹腔播散过程。对大鼠卵巢腺癌组织行 CD44的免疫组化研究,结果显示卵巢腺癌中有 31.6%的阳性表达,与组织学类型和有无转移之间未见肯定关系。提示除 CD44以外,还会有其它粘附分子参与卵巢癌的腹腔播散过程。

(5)以多种化学药物和不同照射剂量以及辐射联合化学药物作用于体外培养的 3AO细胞和 M951细胞,结果显示这两种细胞对 5-氟脲嘧啶和更生霉素的敏感性相似,对顺铂、长春花碱和环磷酰胺的敏感性有差异。辐射对 M951细胞的杀伤作用不如 3AO细胞,加入顺铂和长春花碱后,杀伤作用增强,说明放射联合化疗药物可协同杀伤卵巢癌细胞。

(6)M951细胞接种裸鼠腹腔后,分 2组进行治疗,结果显示单纯照射无治疗作用,低剂量顺铂单独或联合照射均可部分抑制卵巢癌细胞的腹腔播散,高剂量顺铂联合照射可完全抑制腹腔播散。表明必须也是可能建立科学的放疗化疗联合方案,以最大限度地提高卵巢癌的治疗(包括抑制腹腔播散)效果。

本研究结果中关于卵巢癌高粘附力细胞亚系的建立、大鼠卵巢肿瘤组织的部分病理变化及腺癌组织 CD44表达、卵巢癌细胞体外粘附腹膜模型的建立、用不同恶性潜能的亚系研究卵巢癌细胞表达 CD44与粘附腹膜能力的关系,以及在体和离体相结合研究放射联合化学药物治疗卵巢癌细胞腹腔播散等内容,尚未见文献报道。这些研究结果,不仅有助于深化对卵巢癌发病机制的认识,为开辟新的治疗途径提供线索,同时也为卵巢癌腹腔播散的治疗提供了重要的实验依据,值得临床验证和应用。所建立的模型和方法还为进一步研究提供了重要的基础条件。

关键词　卵巢癌;致癌;二甲基苯蒽;形态学;CD44;透明质酸;粘附;播散;转移;化疗;放疗;放化疗
中图法分类号　R737.31
(收稿: 1997-12-09;修回: 1998-01-06)
(编辑　王　红)

* 程　湘　女,34岁,主治医师,讲师,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net